



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

بررسی شیوع کلونیزاسیون استرپتوکوکوس آگالاکتیه در زنان باردار بندر بوشهر با استفاده از روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروب های فلوئورسنت (FISH)

دانشجو: مرجان نوروزی اصفهانی

استاد راهنما: دکتر سعید تاج بخش

دانشیار گروه میکروب شناسی و انگل شناسی

استاد راهنما: دکتر محمد ایمان عینی

استادیار گروه میکروب شناسی

استاد مشاور آمار: دکتر نیلوفر معتمد - استادیار گروه پزشکی اجتماعی

استاد مشاور: دکتر الهام رحمانی - استادیار گروه زنان

این طرح با تصویب و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر اجرا گردیده است.

شهریور ۱۳۹۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سپاس فدایی را که توفیق سپری لحظه هایمان را در

اقتیانوس بیکران علم و دانش به ما ارزانی داشت.

تقدیم به بزرگترین سرمایه های زندگیم

آنان که دعای خیرشان پیوسته ضامن موفقیت هایم است

پدر بزرگوار و مادر مهربانم به پاس حمایت ها، تشویق ها و محبت

های بی دریغشان

خواهران عزیزم، بهناز که وجودش همواره امید بخش لحظه های زندگیم و مژگان که

همواره حامی من بوده است.

برادران خوبم که دلگرمی و امید آنها همیشه مشوق من برای ادامه راه بود .

با تشکر و قدر دانی از :

استاد گرامی جناب آقای دکتر سعید تاج بخش که اگر صبر و بزرگواری ایشان در این راه نبود، بی شک این نامه پایان بی آغاز و بی فرجام می ماند. از زحمات، حمایت ها و راهنمایی های ارزنده ایشان سپاسگذارم.

استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محمد ایمان عینی که در تمام طول دوران تحصیل راهنمایم بوده اند.

سرکار خانم دکتر نیلوفر معتمد، استاد مشاور آمار و سرکار خانم دکتر الهام رحمانی که در این پژوهش یاریگر من بودند.

مدیریت محترم گروه میکروب شناسی و انگل شناسی جناب آقای دکتر سعید تاج بخش و همچنین کلیه اساتید و اعضا هیئت علمی گروه میکروب شناسی و انگل شناسی که همواره اینجانب را مورد لطف و حمایت خود قرار دادند.

جناب آقای دکتر اقبالی و سرکار خانم دکتر وحدت و جناب آقای دکتر استوار که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.

معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر که در تصویب و تامین بودجه این پایان نامه کمال همکاری را داشتند.

دوست خوبم سرکار خانم سمیه غریبی که در تمامی گام های مربوط به این پژوهش صمیمانه یاریگرم بود.

**دوستان عزیزم سرکار خانم مهرانذخت سیروس و سرکار خانم گل اندام آسایش
کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر که از
توجهات ، دلگرمی و حمایت هایشان در این مدت بهرمند بوده ام.**

**مدیریت محترم بیمارستان فاطمه زهرا و بیمارستان سلمان فارسی شهر بوشهر که در
تسهیل امر نمونه گیری همکاری صمیمانه داشتند.**

**سرکار خانم نوشین امیر عضدی مسئول محترم زایشگاه بنت الهدی شهر بوشهر که
دلسوزانه زمینه لازم را برای تهیه نمونه فراهم نمودند.**

**پرسنل زایشگاه بنت الهدی که در مدت جمع آوری نمونه صمیمانه و با حسن نیت بسیار
به من یاری رساندند.**

**مسئول و پرسنل محترم زایشگاه بیمارستان سلمان فارسی که در جمع آوری نمونه مرا
مورد مساعدت خود قرار دادند.**

**و با تشکر دوستان عزیزم خانم دکتر فاطمه مرادی و خانم دکتر زهرا شریفی و جناب
آقای جمال فلاحتی که از حمایت های دوستانه شان بهره مند بوده ام.**

**سرکار خانم گلی مرادی همکار گرامی و عزیز که جهت استریلیزاسیون مواد نهایت
همکاری را با اینجانب داشتند.**

چکیده

استرپتوکوکوس آگالاکتیه (استرپتوکوک های گروه B یا GBS) در تعدادی از خانم ها کلونیزه می شود و ممکن است از مادر به نوزاد منتقل گردد. GBS یکی از عوامل اصلی مننژیت و سپسیس نوزادی می باشد. شیوع کلونیزاسیون GBS در زنان باردار کشورهای مختلف و حتی شهرهای هر کشور ممکن است بسیار متفاوت باشد. به منظور اجرای سیاست های صحیح پیشگیری، لازم است شیوع این باکتری در نقاط مختلف کشورمان تعیین گردد. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع کلونیزاسیون استرپتوکوکوس آگالاکتیه در زنان باردار بندر بوشهر با استفاده از روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروب های فلوئورسنت (FISH) (بود. نمونه سواب واژن از ۳۳۲ زن باردار که سن حاملگی آن ها ۳۵ هفته یا بیشتر بود، گرفته شد. نمونه های مذکور در محیط لیم براث تلقیح شدند. به منظور ارزیابی تکنیک FISH، بر روی ۲۸۵ نمونه از کل ۳۳۲ نمونه، روش جداسازی و شناسایی کلنی ها با تک نیک های مرسوم آزمایشگاهی انجام پذیرفت. تمامی ۳۳۲ نمونه پس از یک غنی سازی ۷ ساعته با روش FISH با استفاده از پروب های الیگونوکلوئیدی مورد آزمایش قرار گرفتند. داده ها با استفاده از آمار توصیفی و آزمون آماری کای دو، من ویتنی و رگرسیون لجستیک تجزیه و تحلیل و بررسی شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، هم حساسیت و هم ویژگی FISH برای تشخیص استرپتوکوکوس آگالاکتیه ۱۰۰٪ بود. استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ۳۱ نفر از کل ۳۳۲ خانم باردار تشخیص داده شد. بنابراین شیوع کلونیزاسیون آن معادل ۹/۳٪ بود. نوع زایمان و سن حاملگی مادر در زمان نمونه گیری، ارتباط معنی داری با نتیجه آزمایش FISH داشت. به طوری که در خانم های با زایمان طبیعی و خانم هایی که در زمان نمونه گیری سن حاملگی آن ها کمتر از ۳۷ هفته بود، میزان شیوع بالاتری مشاهده گردید. با توجه به اینکه پس از غنی سازی کوتاه مدت (۷ ساعته) در لیم براث، FISH با پروب های الیگونوکلوئیدی حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برای شناسایی استرپتوکوکوس آگالاکتیه نشان داد، لذا با این تکنیک می توان بسیار سریع تر از روش جداسازی و شناسایی با روش های مرسوم آزمایشگاهی، باکتری مذکور را تشخیص داد و خانم های باردار را غربالگری نمود. با توجه به شیوع بدست آمده در این مطالعه، انجام آزمایش قبل از زایمان و تجویز آنتی بیوتیک برای زنان باردار حامل GBS جهت پیشگیری از عفونت در نوزادان آن ها در بندر بوشهر ضروری به نظر می رسد.

کلیدواژه ها: استرپتوکوکوس آگالاکتیه، شیوع، زنان باردار، FISH

فصل ۱ مقدمه	۱۵
۱-۱ کلیات	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱ استرپتوکوکوس آگالاکتیه	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۱ تاریخچه	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۲ مورفولوژی و فیزیولوژی	۵
۱-۱-۱-۳ زیستگاه	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۴ ساختمان آنتی ژنی	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۵ بیماری زائی و فاکتورهای ویروالانس	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۶ اپیدمیولوژی و انتقال	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۷ میزان بروز (incidence) و پراکنش سروتیپی ایزوله ها.	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۸ بیماری زائی و ایمنی	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۹ بیماری های کلینیکی	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۱۰ تشخیص آزمایشگاهی	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۱۱ پیشگیری	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۱۲ واکسن	Error! Bookmark not defined.
۱-۱-۱-۱۳ درمان	Error! Bookmark not defined.
FISH	Error! Bookmark not defined.
FISH تاریخچه	Error! Bookmark not defined.
FISH مراحل تکنیک	Error! Bookmark not defined.

Error! Bookmark not defined..... ۱-۱-۲-۳- جایگاه هدف

Error! Bookmark not defined..... ۱-۱-۲-۴- پروب

Error! Bookmark not defined..... ۱-۱-۲-۵- فلوئوروکروم ها

Error! Bookmark not defined..... ۱-۱-۲-۶- نشان دار کردن پروب ها

Error! Bookmark not defined..... ۱-۳- اهداف و فرضیات مطالعه

Error! Bookmark not defined..... ۱-۳-۱- اهداف اصلی

Error! Bookmark not defined..... ۱-۳-۲- اهداف فرعی

Error! Bookmark not defined..... فصل دوم - مروری بر متون

Error! Bookmark not defined..... فصل سوم

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱- آماده سازی، کشت و نگهداری سویه های کنترل

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۱- مواد لازم

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲- تهیه مواد

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱- محیط کشت آگار خون گوسفندی

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۲- محیط BHI- آگار خون دار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۳- محیط تریپتون سوی آگار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۴- محیط شکلات آگار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۵- محیط کلمبیا آگار خون دار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۶- محیط BHI- آگار خون دار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۷- محیط تیوگلیکولات

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۸- محیط MRS

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۹ - محیط MRS - آگار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۰ - سیستئین هیدروکلراید ۵۰ mg/ml

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۱ - محیط مایع MRS حاوی سیستئین

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۲ - محیط MRS - آگار حاوی سیستئین

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۳ - بافر PBS

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۴ - محیط سدیم هیپورات

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۵ - معرف نین هیدرین

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۶ - محیط نگه دارنده سویه ها (اسکیم میلک)

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۷ - محیط مایع کلرید سدیم ۶/۵٪

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۸ - محیط بایل اسکولین آگار

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۲-۱۹ - محلول سدیم داکسی کولات

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳ - روش انجام آزمایش ها

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۱ - CAMP آزمایش

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۲ - آزمایش هیدرولیز هیپورات

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۳ - آزمایش تحمل نمک (رشد در محیط مایع کلرید سدیم ۶/۵٪)

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۵ - تست حساسیت به باسیتراسین و SXT

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۶ - تست کاتالاز

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۷ - آزمایش حلالیت در صفرا

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۳-۸ - آزمایش حساسیت به اپتوچین

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۴ - سویه های کنترل

Error! Bookmark not defined..... ۳-۱-۴-۱ / استرپتوکوکوس آگالاکتیه تهیه شده از آزمایشگاه

Error! Bookmark not defined..... مرجع سلامت

Error! Bookmark not defined.(PTCC 1768) DSM 2134 ۳-۱-۴-۲ / استرپتوکوکوس آگالاکتیه

۳-۱-۴-۳ / انتروکوکوس فاسیوم (Entrococcuss faecium) تهیه شده از آزمایشگاه مرجع

Error! Bookmark not defined..... سلامت

Error! Bookmark not defined.(PTCC 6101) ATCC 27607 ۳-۱-۴-۴ / استرپتوکوکوس سوبرینوس

Error! Bookmark not defined.(PTCC 1449) ATCC 10556 ۳-۱-۴-۵ / استرپتوکوکوس سانگوئیس

Error! Bookmark not defined.....ATCC 4356 ۳-۱-۴-۶ لا کتوباسیلوس اسیدوفیلوس

Error! Bookmark not defined..... (PTCC 1643)

Error! Bookmark not defined.(PTCC 1744) DSM 20052 ۳-۱-۴-۷ لاکتوباسیلوس فرمنتوم

Error! Bookmark not defined..... ۳-۲ محیط کشت لیم مایع (Lim Broth)

Error! Bookmark not defined..... ۳-۲-۱ کنترل کیفی محیط لیم مایع

Error! Bookmark not defined..... ۳-۳ جمع آوری نمونه

Error! Bookmark not defined..... ۳-۴ غنی سازی در محیط مایع لیم

Error! Bookmark not defined..... ۳-۵ فیکساسیون سویه های کنترل

Error! Bookmark not defined..... ۳-۵-۱ روش تهیه محیط لوریبرتانی (LB)

Error! Bookmark not defined..... ۳-۵-۲ فیکساسیون استرپتوکوکها و انتروکوک ها

Error! Bookmark not defined.... ATCC 4356 ۳-۵-۳ فیکساسیون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

Error! Bookmark not defined..... DSM 20052 ۳-۵-۴ فیکساسیون لاکتوباسیلوس فرمنتوم

Error! Bookmark not defined..... FISH ۳-۶

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۱ مواد و وسایل

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲- تهیه مواد

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۱ اتانل ۵۰٪ و ۸۰٪

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۲ ۱ M Tris – HCl [pH ۸]

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۳ ۱۰ mM Tris – Hcl [pH ۸]

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۴ کلرید سدیم ۵ مولار (5 M NaCl)

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۶ بافر هیبریدیزاسیون

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۷ پروب

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۹ بافر شستشو

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۱۰ محلول کار DAPI

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۲-۱۱ ساخت اتاقک مرطوب

Error! Bookmark not defined..... ۳-۶-۳ روش FISH

Error! Bookmark not defined..... ۳-۷ کشت

Error! Bookmark not defined..... ۳-۸ آنالیز آماری

Error! Bookmark not defined..... فصل چهارم-نتایج

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱ نتایج آماده سازی و کشت سویه های کنترل

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱-۱ استرپتوکوکوس آگالاکتیه سویه تهیه شده از آزمایشگاه مرجع سلامت.

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱-۲ استرپتوکوکوس آگالاکتیه DSM 2134

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱-۳ انتروکوکوس فاسیوم تهیه شده از آزمایشگاه مرجع سلامت.

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱-۴ استرپتوکوکوس سوبرینوس ATCC 27607

Error! Bookmark not defined..... ۴-۱-۵ استرپتوکوکوس سانگوئیس ATCC 10556

Error! Bookmark not defined.....ATCC 4356 لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۴-۱-۶

Error! Bookmark not defined..... DSM 20052 لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱-۷

Error! Bookmark not defined..... کنترل کیفی محیط لیم مایع ۴-۲

Error! Bookmark not defined..... ۷ ساعت اینکوباسیون ۴-۲-۱

Error! Bookmark not defined..... ۷ ساعت اینکوباسیون ۴-۲-۲

Error! Bookmark not defined..... FISH بر روی سویه های کنترل ۴-۳

Error! Bookmark not defined..... FISH نمونه های واژینال ۴-۴

Error! Bookmark not defined..... کشت ۴-۵

Error! Bookmark not defined..... نتایج آنالیز آماری ۴-۶

Error! Bookmark not defined..... فصل ۵ - بحث و نتیجه گیری

Error! Bookmark not defined..... منابع

Abbreviations

GBS = Group B Streptococcus

CNS =Central Nervous System

CAMP = Christie , Atkins and Munch- Petersen

CSF = Cerebro Spinal Fluid

PCR = Polymerase Chain Reaction

IAP =Intrapartum Antibiotic Prophylaxis

CDC = Center for Disease Control and Prevantation

FISH = Fluorescent In Situ Hybridization

ISH = In Situ Hybridization

HRP = Horseradish Peroxidase

DIG =Digoxigenin

TSA =Tyramide Signal Ampilfication

HNPP = Hydroxy -3- Naphtoic Acid-2'- Phenylanilide Phosphate

CARD FISH = Catalysed Rporter Deposition

CF= Cyclic Fibrois

BHI =Brain Heart Infusion

MRS = Mann , Rogosa, Sharp

PBS= Phosphate Busffer Saline

ATCC = American Type Culture Collection

PTCC =Persian Type Culture Collection

LB = Luria –Bertani

CFU = Colony Forming Unit

SDS = Sodium Dodecyle Sulfate Solution

IUD= Intrauterine Devise

LBW= Low Birth Weight

BMI = Body Mass Index

PNA–FISH = Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization

